

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE PROLAKTINEINWIRKUNG AUF DIE MÄMMA

VON

KLAUS LANI
—

1960

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Bredt)

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE PROLAKTINEINWIRKUNG AUF DIE MAMMA

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

KLAUS LANI

aus Nürnberg

MAINZ 1968

Dekan: Professor Dr. L. Diethelm

Referent: Priv. Doz. Dr. Bässler

Korreferent: Professor Dr. H. Bredt

Tag der mündl. Prüfung: 2. Februar 1968



Gesamtherstellung:

Ditters Bürodienst Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
II. Material und Methode	2
A. Fragestellung	2
B. Versuchsmethode	3
III. Ergebnisse und deren Diskussion	4
IV. Literatur	5
A. Biologische Grundlagen	5
B. Psychologische Grundlagen	6
C. Medizinische Grundlagen	7
D. Physikalische Grundlagen	8
E. Chemische Grundlagen	9
F. Mathematische Grundlagen	10
G. Sonstige Grundlagen	11
V. Zusammenfassung des Ergebnisses	12
VI. Literaturverzeichnis	13
VII. Zusammenfassung	14

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methode	2
A. Versuchsanordnung	2
B. Enzymreaktionen	3
III. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen	5
IV. Eigene Untersuchungsergebnisse	10
A. Histologische Befunde	10
B. Enzymhistochemische Befunde	11
1. Alkalische Phosphatase (Azo-Methode)	12
2. Alkalische Phosphatase (Schwermetall-Simultan- Methode)	13
3. Glucose-6-Phosphatase	14
4. Adenosintriphosphatase	15
5. 5'-Nucleotidase	16
6. Lactatdehydrogenase	17
7. Succinodehydrogenase	18
8. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	19
V. Besprechung der Ergebnisse	21
VI. Zusammenfassung	29
VII. Literaturverzeichnis	30

I. EINLEITUNG

Eine Besonderheit der Brustdrüse besteht darin, daß sie sich nur zeitweilig, nämlich während der Laktationsperiode, in voller Funktion befindet. Am Beginn und am Ende eines solchen Zustandes treten innerhalb kürzester Zeit weitgehende Veränderungen in Struktur und Stoffwechsel dieses Organs ein. Die Kenntnis der hormonalen Regulationsvorgänge, die Laktogenese und Galaktopoese bedingen, sind von großer praktischer Bedeutung und unterliegen hormonalen Regulationen, die weitgehend, aber bei weitem nicht gänzlich geklärt sind.

Zur Frage des Angriffspunktes und der Wirkungsmechanismen in der Zelle weist KARLSON (1960) im wesentlichen auf drei Wege einer Beeinflussung des Zellstoffwechsels hin:

1. Durch Aktivierung oder Hemmung bestimmter Enzymsysteme in der Zelle;
2. durch Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran oder der intrazellulären Strukturen;
3. dadurch, daß sie auf die Proteinbiosynthese in der Zelle einwirken.

Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, fermenthistochemisch die Wandlung des Enzymmusters unter Einwirkung von Geschlechtshormonen und des Hypophysenvorderlappenhormons Prolaktin auf die Milchdrüse der Ratte zu untersuchen. Es wurden vier verschieden behandelte Tiergruppen aufgestellt und die Brustdrüse auf folgende Enzyme untersucht:

1. Alkalische Phosphatase
2. Glucose-6-Phosphatase
3. Adenosintriphosphatase
4. 5'-Nukleotidase
5. Laktatdehydrogenase
6. Succinodehydrogenase
7. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

II. MATERIAL UND METHODE

A. VERSUCHSANORDNUNG

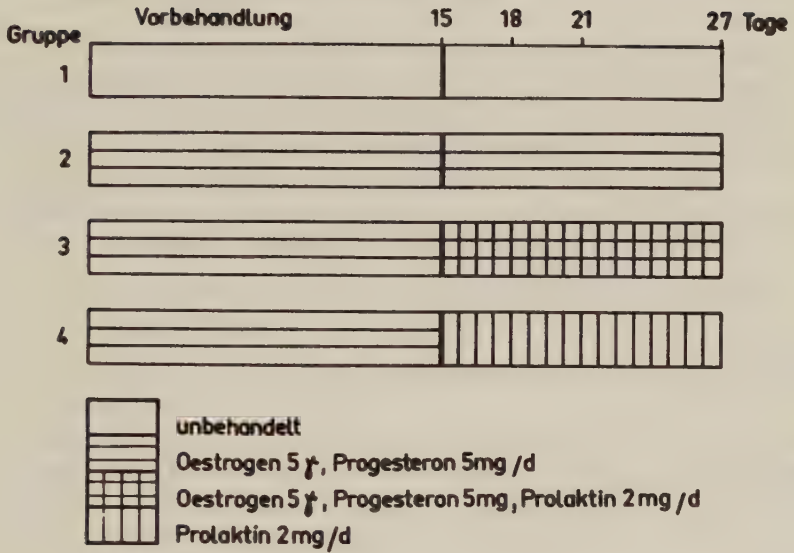
In unserem Versuch verwendeten wir 42 weibliche Albinoratten eines Mischstammes einer Mainzer Tierzuchtanstalt im Alter von etwa 70 Tagen und einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 100 Gramm. Die Tiere wurden kastriert und nach sieben Tagen Erholungszeit mit Hormoninjektionen begonnen. Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt. Die Tiere der ersten Gruppe blieben unbehandelt und dienten zur Kontrolle. In der "ersten Phase" der Behandlung wurde die 2., 3. und 4. Gruppe bis zum 15. Tag ("Vorbehandlungsphase") mit einem Progynon-Proluton-Gemisch (5:5 mg) behandelt, um eine ausreichende Brustdrüsenentwicklung zu bekommen.

Das Follikelhormon wurde in Form des "Progynon B oleosum" Schering (Oestradiolbenzoat) nach Verdünnung mit einem indifferenten Oel (Olivenoel) verabreicht. Das Corpus-luteum-Hormon "Proluton"[†]) Schering wurde unverdünnt injiziert. Beide Hormone wurden als Gemisch intramuskulär gespritzt. In der "zweiten Phase" der Behandlung, vom 15. - 27. Tag, bekam die 2. und 3. Gruppe das gleiche Hormongemisch weitergespritzt, die 3. Gruppe jedoch zusätzlich Prolaktin (Luteotropin) Ferring. Die 4. Gruppe erhielt vom 15. Tag an bis zum Ende der Versuche nur Prolaktin (vgl. Tab. 1). Prolaktin wurde in Gruppe 3 und 4 gesondert gespritzt.

Am 15., 18., 21. und 27. Tag des Versuchs wurden von jeder Gruppe zwei Tiere nach Betäubung mit Nembutal getötet. Dem narkotisierten Tier wurden beide Brustdrüsen des Inguinal- und Abdominalgebietes aus dem Bindegewebe herauspräpariert und sofort mit Kohlensäureschnee auf Gefrierkammern aufgefroren. Die Herstellung der 10-40 μ dicken Gefrierschnitte erfolgte in einem Kryostaten (System DITTES-DUSPIVA) bei - 25°C. Zur Kontrolle dienende, besonders vorbehandelte Schnitte wurden in allen Phasen mitgeführt. Mit Ausnahme der Gefrierschnitte, die zur Darstellung der alkalischen Phosphatase nach der Azofarbstoffmethode nach GOESSNER (1959) dienten, hatten alle Schnitte eine Dicke von 10 μ . Aufnahmen mit dem Photomikroskop der Fa. Zeiss.

[†]) Der Fa. Schering AG., Berlin, danken wir für die freundliche Überlassung eines Teiles der von uns verwendeten Hormonpräparate.

Tab1: Behandlungsschema



B. ENZYMREAKTIONEN

Die Fermente wurden mit folgenden Methoden nachgewiesen:

1. Alkalische Phosphatase (Schwermetall-Simultan-Methode) von v.DEIMLING (1964)

Fixierung der Schnitte in 6,5%-igem Glutardialdehyd 10 Min. bei 4°C.

Inkubationslösung: Bleinitrat 0,1 m - 5 ml; Triäthanolaminpuffer pH 8,5 - 2,9 ml; Kaliumnatriumtartrat 20% - 15 ml; Magnesiumchlorid 0,1 m - 1 ml; Dinatrium-p-nitrophenylphosphat 157 mg; Aqua bidest. 26,1 ml. Inkubationszeit: 60 Min. bei 37°C.

Nachbehandlung: Farbentwicklung in Ammoniumsulfid, Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun und Einbettung in Eukitt.

2. Alkalische Phosphatase (Azofarbstoffmethode) Modifikation nach Goessner (1959)

Fixierung der 2 - 3 mm dicken Gewebsblöckchen 14 Stunden in 4%-igem Formalin bei 4°C.

Inkubationslösung: Natrium-alpha-Naphtylphosphat 25 mg; Emulphor-O-Lösung 1:1 - 5 ml; Natrium-Veronalpuffer 0,1 m pH 9,3 - 25 ml; Echtblausalz B - 50 mg; Aqua bidest. - 20 ml; Inkubationszeit: 40 Min. bei 37°C. Nachbehandlung: Auswaschen in aqua dest. 2 - 3 Min. und Eindeckung mit Eukitt.

3. Glucose-6-Phosphatase (Schwermetall-Simultan-Methode) von v.DEIMLING (1964)

Fixierung der Schnitte in 6,5%-igem Glutardialdehyd 5 Min. bei 4°C.

Inkubationslösung: Bleiacetat 0,1 m - 3 ml; Tiron - 1% - 6 ml; Acetatpuffer pH 5 - 5 ml; Triäthanolamin 0,2 m - 20 ml; Magnesiumchlorid 0,1 - 1 ml; Dinatrium-Glucose-6-Phosphat 125 mg; Aqua bidest. 15 ml; Inkubationszeit: 60 Min. bei 37°C. Nachbehandlung: Farbentwicklung in Ammoniumsulfidlösung. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun und Einbettung in Eukitt.

4. Adenosintriphosphatase (Schwermetall-Simultan-Methode) von v.DEIMLING (1964)

Fixierung der Schnitte in 6,5%-igem Glutardialdehyd 60 Min. bei 4°C.

Inkubationslösung: Tiron 1% - 5 ml; Bleiacetat 0,1 m - 3 ml; Natrium-

acetat 3 m - 5 ml; Magnesiumchlorid 0,1 m - 1 ml; Dinatrium-Adenosin-triphosphat 1% - 6 ml; Aqua bidest. - 36 ml. Inkubationszeit: 60 Min. Nachbehandlung: Farbentwicklung in Ammoniumsulfidlösung, Gegenfärbung in Mayers Hämalan und Einbettung mit Eukitt.

5. 5'-Nucleotidase (Schwermetall-Simultan-Methode) von v. DEIMLING (1964)

Fixierung der Schnitte 60 Min. in 6,5%-igem Glutardialdehyd bei 4°C.

Inkubationslösung: Tiron 1% - 5 ml; Bleiacetat 0,1 m - 3 ml; Natrium-acetat 4 m - 5 ml; Manganchlorid 1% - 1 ml; Dinatrium-Adenosin-monophosphat 1% - 6 ml; Aqua bidest. - 30 ml; Inkubationszeit: 60 Min. bei 37°C. Nachbehandlung: Farbentwicklung in Ammoniumsulfidlösung, Gegenfärbung mit Mayers Hämalan und Eukitt-Eindeckung.

6. Lactatdehydrogenase nach NACHLAS und Mitarb. (1958)

Auf den gegen Verdunstung geschützten Kryostatschnitt wird nachstehende Lösung geträufelt.

Inkubationslösung: DPN (5 mg/ml) - 0,3 ml; Nitro-Bt (5 mg/ml) - 0,3 ml; Phosphat-Puffer pH 7,4 0,2 m - 1,0 ml; Natrium-Lactat 0,5 m - 0,6 ml; Aqua bidest. - 0,8 ml. Inkubationszeit: 10 Min. bei Zimmertemperatur. Nachbehandlung: Fixierung in 10%-igem Formol, steigende Alkoholreihe und Einbettung mit Eukitt.

7. Succinodehydrogenase nach Angaben von RUDOLPH (1960)

Auf den im Thermostat horizontal gelagerten, gegen Verdunstung geschützten Kryostatschnitt wird die nachstehende Lösung getropft.

Inkubationslösung: Tris-Pufferlösung pH 7,2 0,2 m - 10 ml; Succinat-lösung (540 mg Succinat auf 10 ml aqua dest.) - 10 ml; Nitro-BT-Lösung 1%-ig - 10 ml. Inkubationszeit: 30 Min. bei 37°C. Nachbehandlung: Steigende Alkoholreihe und Einbettung mit Eukitt.

8. Glucose-6-Phosphatdehydrogenase nach RUDOLPH und KLEIN (1964)

Die Inkubationslösung wird wie oben beschrieben auf den Kryostatschnitt aufgetropft.

Inkubationslösung: Aqua bidest. - 0,4 ml; Glucose-6-Phosphat - 0,4 mg; TPN - 0,5 mg; Trispuffer pH 7,2 - 0,4 ml; Nitro-BT 1% - 0,2 ml. Inkubationszeit: 30 Min. bei 37°C. Nachbehandlung: Steigende Alkoholreihe und anschließende Eindeckung mit Eukitt.

III. ERGEBNISSE BISHERIGER UNTERSUCHUNGEN

Die weibliche Brustdrüse von Mensch und Tier ist schon lange Gegenstand vieler enzymatischer Untersuchungen. Die ersten Versuche dieser Art wurden von den Biochemikern am Gewebehomogenat vorgenommen. Am häufigsten von allen Fermenten ist die alkalische Phosphatase im Mammagewebe untersucht worden, insbesondere während der Laktation. Nach KRAUT und WEISCHER (1951) soll dieses Enzym neben anderen eine Bedeutung als Reaktionsvermittler bei der Caseinsynthese besitzen. FOLLEY und GREENBAUM (1947) zeigten am Homogenat der Rattenbrustdrüse einen Anstieg des Gehaltes an alkalischer Phosphatase während der Schwangerschaft. Ein Maximum erreicht der Enzymspiegel bei der Geburt und während der Laktation. Erst nach Absetzen der Jungen sinkt der Spiegel auf ein zwischen Laktation und früher Schwangerschaft liegendes Niveau ab. GLOCK und McLEAN (1954) zeigen in ihren Versuchen einen sehr schnellen Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in der Mamma am Ende der Tragzeit gefolgt von einem Abfall der Aktivität während der Involution. Nach MOORE und NELSON (1952) ist der Gehalt an Succinodehydrogenase am laktierenden Tier größer als am normalen. Ein sieben- bis neunfacher Anstieg konnte in den meisten Fällen verzeichnet werden. Nach dieser Zeit wieder Abfall auf Werte der frühen Schwangerschaft. Nach diesen Ergebnissen geht die Differenzierung der Zellstruktur mit dem Anstieg der SDH-Aktivität einher. Spezialisierung der Zelle ist verbunden mit Mengenzunahme der Biokatalysatoren, die Energie mobilisieren. Einen Anstieg der Laktatdehydrogenase während der Stillperiode durch Homogenatuntersuchungen an der Brustdrüse der Maus stellten HERSHEY und Mitarb. fest (1963). HOPKINS und COLE (1962) untersuchten den Einfluß von verschiedenen kombinierten Geschlechtshormonen auf die alkalische Phosphatase hypophysektomierter und oophorektomierter Ratten. In allen Fällen konnte ein Anstieg beobachtet werden. Weiterhin wiesen GRANT (1935) und GREENSTEIN (1942) Phosphatasen im Mammagewebe nach.

Die Entdeckung einer histochemischen Nachweismethode für ein hydrolytisches Enzym der alkalischen Phosphatase, gleichzeitig durch TAKAMATSU und GOMORI (1939), gab dieser Forschungsrichtung die Möglichkeit, die bisherigen Enzymuntersuchungen auf das histologische Bild zu übertragen und teilweise auch zu lokalisieren. Neben dieser Enzymdarstellung entwickelte MENTEN (1944) die Azofarbstoffmethode, die von MANHEIMER und SELIGMAN (1948), GOMORI (1952) und RUTENBERG (1955) weiter verbessert wurde.

Das Verteilungsmuster der alkalischen Phosphatase in der Brustdrüse von Ratten untersuchten zuerst DEMPSEY, BUNTING und WISLOCKI (1947). Die Strukturen, die eine positive alkalische Phosphatase-Reaktion aufwiesen, waren Endothelzellen, Epithelien und Myoepithelien der Gänge und Alveolen. Der Inhalt der Alveolarlumina zeigte schwache bis starke Aktivität, je nach Substrat. In der Brustdrüse der nicht schwangeren Ratten fanden sie eine schwache und diffuse Färbung der Epithelien, die die Endstücke der Gänge umgaben. Die Korbzellen hatten ein intensiv gefärbtes Plasma. Bindegewebe, Fettzellen und Endothelien der Gefäße zeigten in dieser Phase keine Aktivität. Am 13. Tag der Tragzeit war der Phosphatasegehalt der die Gänge und Alveolen umgebenden Zellen unverändert. Das Kapillarbett, das die Alveolen umgibt, war reicher als früher und die Endothelzellen, vorher negativ, hatten einen beachtlichen Gehalt an Phosphatasen gewonnen. Gegen Ende der Tragzeit und während der Laktation wurden die Phosphatasen in den sternförmigen Korbzellen immer geringfügiger, dagegen wurden die Kapillaren korrespondierend positiv, so daß zu jeder Zeit eine "Phosphatasebarriere" zwischen Blut und Epithel zu finden war. Die Ergebnisse der Untersuchungen von VERNE (1951) stimmen nicht vollständig mit denen von DEMPSEY und Mitarbeitern (1947) überein. Er fand bei nicht graviden Ratten eine schwache Reaktion der Myoepithelien, die sich erst nach Progesteroninjektionen verstärkte. Im Verlaufe der Laktation färbte sich die Basalzone der Acinuszellen an, während das apikale Ende dem Lumen zu hell blieb. Die Reaktion im Bereich der Endothelzellen war inkonstant und nicht deutlich. Die Wirkung von Stilboestrol und Progesteron auf die weibliche Brustdrüse von Ratten untersuchte PERRINI (1953). Er beobachtete, daß unter alleiniger Stilboestrolbehandlung unreifer Tiere die alkalische und saure Phosphatase in den glandulären Strukturen beträchtlich anstieg. Die Enzyme waren hauptsächlich in der äußeren Zellschicht der Gänge und Alveolen lokalisiert. Die saure Phosphatase vornehmlich in den Kernen, die alkalische Phosphatase in den Kernen und im Protoplasma. Bei Progesterongabe erfolgte nur ein leichter Anstieg der Enzymaktivität. Es wird angenommen, daß eine weitgehende Unabhängigkeit der sauren Phosphatase vom Oestrogeneinfluß herrscht. Dagegen zeigt die alkalische Phosphatase eine enge Beziehung zum Oestrogen, die sich auf physiologische und pathologische Wachstumsprozesse im Sinne einer Fermentaktivierung erstreckt. Beispielsweise läßt sich experimentell bei kastrierten Tieren durch Oestrogen das Brustdrüsengewebe wieder phosphataseaktivieren (WANDREY, 1951). SILVER (1954) konnte in seinen Experimenten an verschiedenen Tierarten, unter anderem an der Ratte, eine scharf begrenzte Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Myoepithelien und eine leichte Aktivität in den Kapillarenendothelien der laktierenden Drüsen nachweisen.

Auch HOLMES (1956) gelangte zu ähnlichem Ergebnis. Er entnahm das Gewebe von trächtigen und laktierenden Kaninchen, und zwar am 14., 20., 23. und 24. Tag nach der Paarung und am 9. und 14. Tag nach der Geburt. Mit der Azomethode färbten sich vom 14. Tag der Trächtigkeit an nur die Korbzellen. Alle anderen Strukturen blieben negativ. Mit der Metallsalzmethode zeigte sich, zusätzlich zu den intensiv dunklen Kornzellen, eine leichte und variable Verfärbung der Kerne, der Kapillarwände und des Stromas. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf das Dreifache ließ die Verfärbung deutlicher werden. Ein Übergang der Aktivität der alkalischen Phosphatase von den Korbzellen auf die benachbarten Gefäßendothelien im letzten Teil der Schwangerschaft konnte nicht bestätigt werden. Von BRETHFELD (1966) wurde die Brustdrüse von 25 Ratten während der Laktation, Tragzeit, Involution und Milchstauung auf verschiedene Fermente hin untersucht. Eine Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Myoepithelien konnte aufgezeigt werden, dagegen nicht in den Endothelien der Gefäße.

In neuerer Zeit ist auch das Studium der Zellfermente auf eine große Zahl von Erkrankungen der Brustdrüse angewendet worden. Man hoffte, mit den histochemischen Methoden den großen Vorteil der Lokalisation einer chemischen Substanz oder Enzymaktivität ausnützen zu können. Bei vergleichenden Studien der Enzymaktivität können Ähnlichkeiten oder Unterschiede bei verschiedenen Tumoren aufgedeckt werden. NOVIKOFF (1960) untersuchte normales Mammagewebe, gutartige Veränderungen und dreizehn verschiedene Carcinome der Brustdrüse mittels der Darstellung der Adenosintriphosphatase. Im normalen Gewebe färbten sich die Zellgrenzen der Basalzellschicht der Drüsen und Gänge. Ebenso die Myoepithelzellen. Bei den Carcinomen ergaben sich unterschiedliche Anfärbungen. Tumorzellen im Lymphknoten färbten sich deutlich im Gegensatz zum umliegenden normalen Gewebe. Starke Reaktion fand er im Stroma der Fibroadenome und Fibrosarkome. HOLZNER und KAUFMANN (1965) beobachteten als auffälligste Veränderung eine starke Intensivierung der Adenosintriphosphatase-Aktivität im Bindegewebe bei allen mit stärkerer Proliferation der epithelialen Elemente einhergehenden Prozessen, insbesondere beim Carcinom. Das Verhalten des Fermentes in den Epithelzellen ist uneinheitlich. Die Aktivität der 5'-Nucleotidase studierten WACHSTEIN, MEISEL und FALCON (1959) an dreizehn Carcinomen der Brustdrüse. Bei keinem einzigen Carcinom konnte eine Anfärbung gesehen werden. Die Stromareaktion variierte beträchtlich. Bei Fibroadenomen und Fibrosarkomen war die Aktivität des Stromas nur schwach. Von der Succinodehydrogenase wurde allgemein herausgefunden, daß sie in den Zellneubildungen vieler

Tumoren deutlich reduziert ist (MONIS, NACHLAS und SELIGMAN, 1959). Hochdifferenzierte Carcinome zeigten stärkere Aktivität als undifferenzierte. FORAKER (1956) sah die Farbablagerungen gleichermaßen stark im normalen Gewebe wie im benachbarten Tumorgewebe. Stärkere Reaktion der Succinodehydrogenase zeigte sich allerdings in gangähnlichen Strukturen. In Stroma, Gefäßen und Entzündungszellen war nur wenig zu sehen. MELNICK und BULLOCK (1959) sahen reichlich Succinodehydrogenase in differenzierten Adenocarcinomen, weniger bei scirrhösen Carcinomen. Keine Aktivität sah man beim medullären Carcinom. MONIS und Mitarbeiter (1959) fanden dagegen keine bis schwache Aktivität bei verschiedenen Carcinomen und gutartigen Veränderungen der Brustdrüse. WANDREY (1961) hat bei 50 Probeexcisionen weiblicher Brustdrüsengeschwülste außer der alkalischen Phosphatase auch die Succinodehydrogenase im histologischen Schnitt dargestellt. Die Formazankristalle fanden sich ausschließlich in den epithelialen Gewebsanteilen, vereinzelt im Bindegewebe. Durch Vergleich der Exstirpate vor der Menopause mit denen in der Menopause waren erstere in wesentlich höherer Zahl deutlich succinodehydrogenase-aktiviert.

Eine Vielzahl von Autoren berichteten über die unspezifische alkalische Phosphatase bei verschiedenen pathologischen Veränderungen der menschlichen Brustdrüse. Die mitgeteilten Beobachtungen über das Verhalten des Enzyms bei Geschwülsten zeigen recht unterschiedliche Resultate (vgl. Tab.2).

Untersuchungen an gesunden menschlichen Brustdrüsen ergaben eine Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Myoepithelzellen der Gänge und Drüsen, sowie in den Kapillaren (ANDRES und MILINOW, 1951; FORAKER, 1956; FANGER und BARKER, 1959).

Tab. 2 Alkalische Phosphatase

Autoren	Patholog. Veränderung der Mamma	Enzymaktivität und Lokalisation
KABAT u. FURTH (1941)	Carcinom	keine Aktivität
MANHEIMER u. SELIGMAN (1948)	Carcinom (undifferenziert)	keine Aktivität
	Adenocarcinom	keine Aktivität
	gutartige Tumoren	Epithel (regelmäßig)
	Mastopathia fibrosa cystica	Epithel
	Fibroadenom	Epithel, Basalmembran u. Gefäßendothel

HARD, PRATT-THOMAS u. BELKIN (1948)	Carcinom	meist keine Aktivität (wenige zeigten stellenwei- se Anfärbung. Oft beträcht- liche Reaktion d. Stroma)
ANDRES u. MILINOW (1951)	Carcinom (adeno- matös) Carcinom (scirrhus)	schwache Aktivität, BG aktiv keine Aktivität; BG aktiv
DRENNAN (1952)	Carcinom gutartige Tumoren: a) vor Menopause b) nach Menopause	keine Aktivität deutliche Aktivität i. Epithel wenig Aktivität i. Epithel
GLÜCK (1952)	Carcinom Adenocarcinom Fibroadenomatose Mastopathia fibrosa cystica	keine Aktivität Epithel Epithel keine Aktivität
NOSALERIC (1954)	Fibroadenom Mastopathia fibrosa cystica Carcinom	Epithel, BG, Gefäßstrukturen Epithel schwache Aktivität (Kerne u. Nucl.)
FORAKER (1956)	Carcinom	Anfärbung d. Kerne
HAYASHI u. Mitarb. (1955)	Carcinom (intraduct.) Carcinoma simplex	deutliche Aktivität deutliche Aktivität
FANGER u. BARKER (1959)	Carcinom Papillom (intraduct.) Gynäkomastie Adenosis	keine Aktivität Epithel Myoepithelien u. Kapillaren Myoepithelien u. Kapillaren
MELNICK u. BULLOCK (1959)	Adenocarcinom (gut differenziert)	Myoepithelien
MONIS u. RUTENBERG (1960)	Carcinom	Anfärbung d. Lumina
WANDREY (1961)	Mastopathia fibrosa cystica	Myoepithelien, Kapillaren, Fettzellen, kollag. Fasern, Proliferationsknospen Aktivität stellenweise; Stro- ma deutlich positiv.

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

A. HISTOLOGISCHE BEFUNDE

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Die Brustdrüse, zum überwiegenden Teil aus Fettgewebe bestehend, wird von bindegewebigen Septen durchzogen. Es besteht ein reich tubuläres Strukturprinzip. Innerhalb der Septen sehen wir Tubuli, von dicken bindegewebigen Säumen umgeben. Stellenweise erkennt man alveolenähnliche Ausbuchtungen, die teils ein enges Lumen besitzen und teils ohne Lichtung als reine Zellknospen imponieren. Das Epithel ist mehrreihig angeordnet und zeigt kubische Form.

Gruppe 2 15-tägige "Vorbehandlungsphase" Oestrogen/Progesteron; danach 12-tägige Behandlung der Tiere mit Oestrogen/Progesteron (2.Phase)

Am Ende der 15-tägigen Vorbehandlung bietet sich im Schnittpräparat das Bild einer voll ausgebildeten Milchdrüse. Die Läppchen sind durch Fettgewebzüge untereinander getrennt. Die Alveolarlumina, von mittlerer Größe, sind teilweise mit einem inhomogenen, eosinophilen Sekret gefüllt. Die Epithelien, ausgestattet mit einem feinwabigen, eosinophilen Plasma, besitzen kubische Form. Die Zellkerne sind chromatinreich, groß und rund.

2.Phase: 3.Tag: Der Fettgewebssaum um die Drüsenläppchen hat sich verringert. Ansonsten entspricht das Bild dem oben Beschriebenen. 6.Tag: Man erkennt, daß das Fettgewebe gegenüber dem 3.Tag vermehrt ist und in seiner Menge etwa der am 15.Tag entspricht. Die Alveolen zeigen unterschiedliche Größe. In der Mehrzahl sieht man die jetzt ziemlich weite Lichtung von einem homogenen, eosinophilen Material ausgefüllt, das in den Gängen bisher nicht nachzuweisen ist. 12.Tag: Es zeigt sich ein Rückgang der Sekretion. Die Sekretmasse in den Alveolen macht einen aufgelockerten, wabigen Eindruck. Ansonsten gleicht das Bild dem am 6.Tag der Behandlung.

Gruppe 3 15-tägige "Vorbehandlungsphase" Oestrogen/Progesteron; danach 12-tägige Behandlung der Tiere mit Oestrogen/Progesteron/Pro-laktin (2.Phase)

Ergebnis der ersten 15 Tage der Vorbehandlung s. Gr. 2.

3.Tag: Es zeigt sich ebenfalls das Bild einer voll entwickelten Drüse. Die Läppchen sind durch Fettgewebszüge getrennt. Die Alveolen sind unterschiedlich groß und mit Sekret gefüllt, das teils homogen, teils blasig aufgelockert erscheint. Die Zellgrenzen sind nicht klar dargestellt und scheinen in das Sekret fließend überzugehen. Die Zellkerne stehen basal, sind klein und chromatinreich. Das Cytoplasma ist feinwabig verändert. 6.Tag: Das Fettgewebe ist vom Drüsenkörper fast völlig verdrängt. Weite Alveolen sind randgefüllt mit homogenem, eosinophilem Sekret. Das Epithel ist abgeflacht, und die Kerne, länglich, oval, sind eng an der Wand anliegend. 12.Tag: Zwischen den Drüsenläppchen sind wieder Straßen von Fettgewebe zu finden. Die Sekretion ist vermindert. Die Alveolen zeigen unterschiedliche Größe, mit wechselnder Füllung der Hohlräume. Die Epithelien sind wieder kubisch.

Gruppe 4 15-tägige "Vorbehandlungsphase" Oestrogen/Progesteron; danach 12-tägige Behandlung der Tiere mit Prolaktin (2.Phase)

Ergebnis der ersten 15 Tage Vorbehandlung s. Gr.2.

3.Tag: Die einzelnen Drüsenläppchen sind in einem schmalen Saum Fettgewebe gelagert. Die Alveolen sind unterschiedlich weit und mit Sekret gefüllt. Die Epithelien sind kubisch, die Zellkerne groß und rund. 6.Tag: Das Drüsen- gewebe hat den gesamten zur Verfügung stehenden Raum eingenommen und das Fettgewebe fast völlig verdrängt. Die Alveolen sind maximal gefüllt mit eosinophilem Sekret, ihre Septen hochgradig verschmälert. Teilweise sind von den Wänden nur noch in die Lichtung vorspringende Leisten zu sehen, so daß mehrere Alveolen zu einer großen verschmolzen sind. Die Epithelien und Kerne sind abgeflacht. Die Gänge zeigen gleichermaßen starke Füllung. 12.Tag: Die einzelnen Drüsenläppchen, erneut von Fettgewebe umgeben, zeigen Rückbildungstendenz. Die Sekretmassen in den Alveolen und Gängen erscheinen aufgelockert und vermindert. Das Epithel in verengten wie auch weiten Drüsenendstücken zeigt zum Teil wieder kubische Form; die Zellkerne sind groß und rund.

B. ENZYMHISTOCHEMISCHE BEFUNDE

Da wir feststellen konnten, daß am 15.Tag der "Vorbehandlungszeit" die Brustdrüse der Tiere durchweg einen gleichen Entwicklungsstand aufwies, konnten wir diesen Zeitpunkt der Entwicklung als Ausgangsbasis für annähernd quantitative Angaben der Enzymaktivität nach ZIMMERMANN (1959) wählen.

Der jeweilige enzymhistochemische Befund am 15. Tag der "Vorbehandlungsphase" ist nicht bei jedem einzelnen Ferment und jeder Gruppe aus Übersichtsgründen nochmals angeführt, sondern er ist aus der Beschreibung der Gruppe 2 immer ersichtlich. Bei Zeitangaben beginnt die Zählung am Ende der Vorbehandlungszeit.

1. Alkalische Phosphatase nach der Azofarbstoffmethode

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Die Azofarbstoffmethode und die Schwermetallmethode ergeben bei den Kontrolltieren grundsätzlich übereinstimmende Bilder in der Verteilung der Enzymaktivität.

Im Übersichtspräparat der Mamma sieht man längliche, zum Teil kreisrunde, angeschnittene Gangsysteme mit freiem Lumen. Die meisten Gänge besitzen kolbig verdickte, rundliche, zellreiche Ausbuchtungen. Die Gangepithelien zeigen an ihrer Basis ein scharf begrenztes, homogenes, braun-schwarzes Band. Die Kerne der Epithelien, stark phosphatasehaltig, sind besonders scharf dargestellt durch die Schwermetallmethode. Im 40 μ -Dickschnitt erkennt man mit der Azofarbstoffmethode, wie die alveolenähnlichen Ausbuchtungen von fingerförmigen Fortsätzen der Myoepithelien umfaßt werden. Das Bindegewebe, die Fettzellen, Gefäße und Nerven weisen keinerlei Phosphatase-Aktivität auf. In den Bindegewebssepten fallen rundliche, ovale bis längliche Gebilde auf. Sie liegen solitär, zum Teil gruppiert und zeigen positive Reaktion. Es dürfte sich um Mastzellen handeln, die zahlreich in der Brustdrüse der Ratten vorhanden sind.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Die Brustdrüse der Tiere, durch 15 Tage lange Oestrogen-Progesteron-Vorbehandlung zu vollen Entwicklung gebracht, zeigt scharf begrenzte, reaktionspositive Myoepithelien, die sternförmig die kugelige Wölbung der Endstücke umgreifen. Am 3. Tag nach der Vorbehandlungszeit erscheinen die Alveolen weiter vergrößert, die Myoepithelien noch mehr auseinandergedrängt und gedehnt. Vereinzelt sieht man phosphatasepositive Kapillarendothelien. Am 12. Tag der Behandlung war es nicht möglich, eine klare Darstellung der Korbzellen zu erreichen. Ein Rückgang der Farbintensität ist zu beobachten.

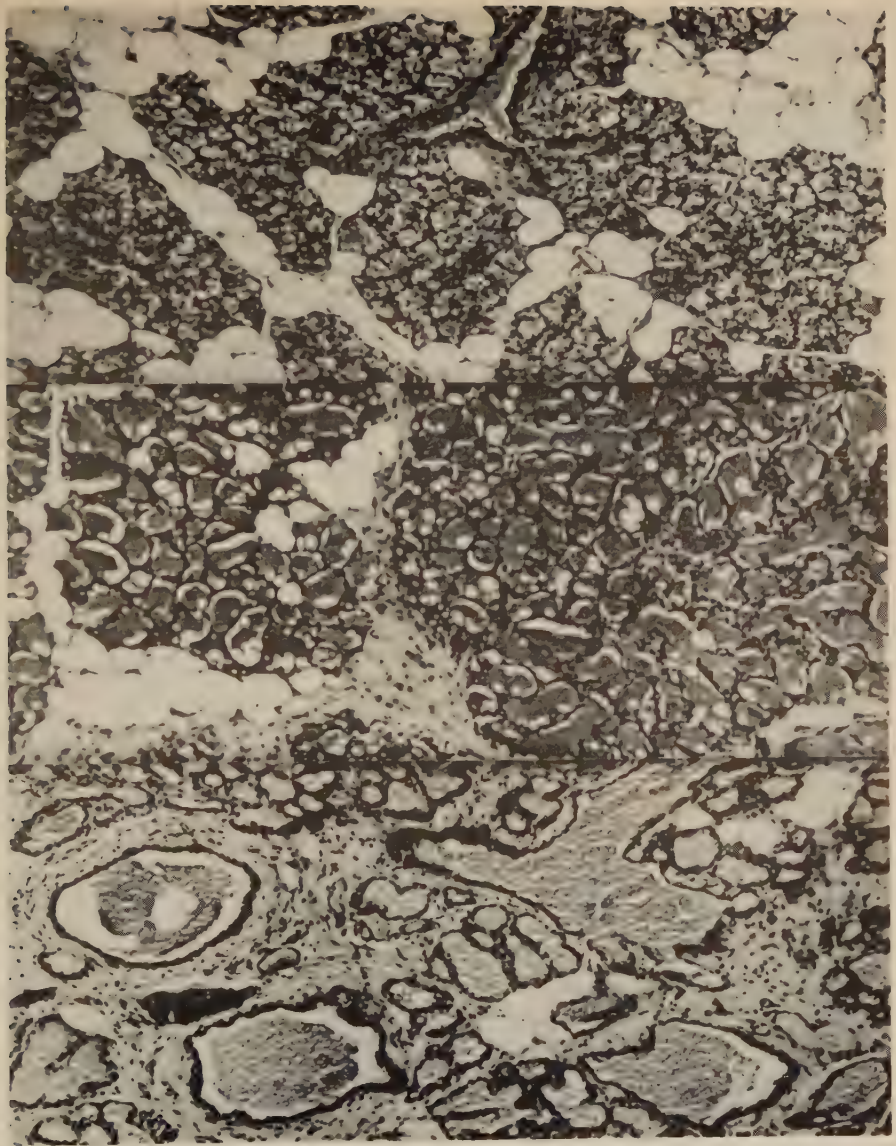


Abb.1 Rattenmammas: Form., Paraff., HE., Vergr. ca. 90 x

- a) Oestrogen, Progesteron 15 Tage, ansl. 3 Tage Prolaktin (Gruppe 4). Lobuläre Differenzierung mit beginnender Sekretion.
- b) Oestrogen, Progesteron 15 Tage, ansl. Prolaktin 6 Tage (Gruppe 4). Bild der vollständig entwickelten laktierenden Mammas. Verdrängung des Fettgewebes.
- c) Oestrogen, Progesteron 15 Tage, ansl. 12 Tage Prolaktin (Gruppe 4). Rückgang der Sekretion. Gangektasien, Fibrose.



Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Unter der dreifach kombinierten Hormonbehandlung erscheinen die Myoepithelien nach den ersten drei Tagen nur noch als fadenförmige, dünne Gebilde über der prall gefüllten Alveole. Sah man nach diesen Tagen nur vereinzelt eine Kapillare, so beobachtet man jetzt am 12.Tag eine Vermehrung des Kapillarbettes mit positivem Reaktionsausfall. Dagegen hat die typische Darstellung der Myoepithelien mehr und mehr abgenommen.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Unter der reinen Prolaktinbehandlung, drei Tage nach Ende der Vorbehandlungsperiode, sind die Alveolen stark gefüllt mit Sekret. Die Korbzellen lassen sich nur teilweise gut darstellen und zeigen einen Rückgang der Fermentaktivität. Enzymaktive Kapillaren sind nur noch vereinzelt zu sehen. Nach dem 12.Tag ist die charakteristische Strukturdarstellung der Myoepithelien nicht mehr sichtbar.

2. Alkalische Phosphatase nach der Schwermetall-Simultan-Methode

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere) siehe unter Azomethode Gr. 1

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Die Darstellung des Enzyms in der Brustdrüse der Ratte mit dieser Methode ist diffus und nicht scharf begrenzt, wie man es bei den Kontrolltieren sah. Dadurch ergeben sich Schwierigkeiten für die Lokalisation des Fermentes.

Am Ende der Vorbehandlungszeit sehen wir das Enzym in allen Epithelien der Drüsenläppchen, ohne eine örtlich betonte Ablagerung des Farbstoffes festzustellen. Lediglich die Zellkerne heben sich unregelmäßig deutlich gegen ein helles Zellplasma ab. Mit fortschreitender Hormonbehandlung hat sich 6-12 Tage später eine basal bevorzugte Enzymaktivität in den Alveolen herauskristallisiert. Während der ganzen Zeit wiesen die Gangepithelien eine nur geringe Fermenttätigkeit auf. Vereinzelt ist eine Kapillare dargestellt.

Gruppe 3 (Oestrogen:Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Hier zeigt sich bereits nach dreitägiger Behandlung eine basal betonte Enzymaktivität mit mäßig gefüllten Alveolen, deren Sekret jedoch kräftige spezifi-

sche Reaktion bietet. Am 6.Tag zeigt der überwiegende Teil der Läppchen eine starke Sekretion. Die Drüsenepithelien weisen keinerlei Phosphatasegehalt auf, während das Sekret stark verfärbt im Vordergrund steht. Ein geringer Teil von schwach sezernierenden Alveolen besitzt noch basale Anfärbbarkeit. Nach dem 12.Tag beobachtet man einen deutlichen Rückgang der Sekretion und eine erneute basale Enzymaktivität. Während des oben beschriebenen Zeitraumes nahm die Aktivität in den Gangepithelien eindeutig zu.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Am 3.Tag zeigt sich eine deutlich zwischen Basalmembran und Kernen liegende Enzymaktivität. Die Epithelien darüber erscheinen hell und durchsichtig. Das Sekret im Lumen ist braun-schwarz verfärbt. Die Gangepithelien sind ohne Reaktion. Am 6.Tag herrscht eine Anfärbung des Sekrets in den erweiterten Alveolen vor, deren Wände selbst keine Aktivität mehr aufweisen. Am 12.Tag beobachtet man neben einem deutlichen Rückgang der anfangs gut ausgebildeten Drüsenläppchen eine erneut diffuse Darstellung mit Rückgang der Enzymaktivität, die bei noch gut ausgebildeten, weitlumigen Alveolen völlig fehlen kann.

3. Glucose-6-Phosphatase

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Die enzymhistochemische Darstellung dieses Enzyms bei Kontrolltieren unterscheidet sich in keiner Weise von der der alkalischen Phosphatase. Die basale Zellschicht der Gänge und ihrer Ausbuchtungen imponiert als ein homogen dunkel gefärbtes Band, das in der Farbtintensität etwas variiert. Die innerhalb dieser Zone gelegenen Zellkerne sind reaktionspositiv, während die außerhalb liegenden nur schwach oder gar nicht verfärbt sind. Das gleiche trifft für das Zellplasma zu. Nerven, Gefäße, Bindegewebe und Fettzellen sind frei von spezifischen Reaktionen.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Am Ende der Vorbehandlungszeit sieht man zwischen Basalmembran und Zellkern eine gleichmäßige, bandförmige Anfärbung der Alveolen. Das Zellplasma selbst erscheint nur schwach positiv, während die Kerne deutlich enzymaktiv sind. Die Gangepithelien zeigen vergleichsweise mit den Drüsenepithelien nur wenig oder keine Phosphataseaktivität. Die enzymhistochemischen Unter-

suchungen am 3., 6. und 12.Tag danach, unter gleicher Versuchsanordnung, erbrachten keine neuen Gesichtspunkte.

Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Ausgehend vom Endzustand der Vorbehandlungszeit sieht man in der Brustdrüse nach dreitägiger Hormonbehandlung eine gut abgrenzbare, erneut bandförmige Anfärbung, die unter weiteren Injektionen bis zum 12.Tag abnimmt und schließlich in dieser Art nicht mehr nachweisbar ist. In den Zellkernen ist noch Enzymaktivität sichtbar. Die mit Sekret gefüllten Hohlräume stellen sich gut dar. Die intralobulär gelegenen Gänge zeigen mäßige Aktivität, die interlobulär gelegenen sind reaktionslos.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Bis drei Tage nach den ersten Prolaktininjektionen bleibt die charakteristische, basale Farbstoffablagerung unverändert bestehen. Erst in den folgenden Tagen kommt es zu einem deutlichen Rückgang der Phosphataseaktivität. Am 12.Tag weisen einzelne Drüsenläppchen einen unterschiedlichen Funktionszustand auf, kenntlich an den kleinen kontrahierten Endstücken mit geringerer Lumenweite. Letztere zeigen noch Enzymaktivität, während die weitlumigen, mit Sekret gefüllten Alveolen sie völlig vermissen lassen.

4. Adenosintriphosphatase

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Eine Übersicht des gesamten Schnittpräparates läßt eine Vielzahl von Gewebstrukturen erkennen, die eine Aktivität der Adenosintriphosphatase aufweisen. Am auffälligsten, dunkel bis schwarz gefärbt, erscheinen Gefäße und Nerven der Drüse. Der Querschnitt durch eine mittlere Arterie zeigt die Intima, reich gefältelt, als ein dunkles, gleichmäßiges, die Lichtung begrenzendes Band. Die Media, weit weniger gefärbt, wird wiederum von einem schwarzen Ring, der Adventitia, umgeben. Der Nerv ist gekennzeichnet durch den geschlängelten Verlauf der einzelnen dunklen Nervenbündel. Die Epithelien der Gänge und Drüsen zeigen Phosphataseaktivität. Das Zellplasma erscheint heller als der Kern, dadurch stellt er sich deutlich dar und ist scharf begrenzt. Das Bindegewebe ist stark adenosintriphosphatasehaltig. Quergestreifte Muskelfasern sind völlig reaktionslos.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Nach 15-tägiger Vorbehandlung mit Steroiden läßt sich innerhalb der hier reich entwickelten Drüsenläppchen keine Betonung einer Struktur durch Adenosintriphosphatase erkennen. Die Epithelzellen weisen eine diffuse, teilweise unscharfe Anfärbung mit abzugrenzendem Kern auf. Die weiter vorgenommenen Untersuchungen an drei verschiedenen Versuchstagen erbrachten keine Änderung im enzymhistochemischen Verteilungsmuster. Die mit Sekret gefüllten Alveolen zeigen leichten Phosphatasegehalt. Die oben beschriebene Darstellung der übrigen Gewebsanteile in der Brustdrüse hat sich nicht geändert.

Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Im Vergleich zum histochemischen Reaktionsausfall am 15. Tag der Vorbehandlung ist jetzt nach 3 - 6 Tagen nur schwache Aktivität in den mit Sekret gefüllten Drüsenendstücken zu sehen. Nach dem 12. Tag sind nur die Gangsysteme mit Sekret gefüllt, während die Alveolen ein kaum mehr sichtbares Lumen besitzen und wieder stärker enzymaktiv erscheinen.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Nach dreimaliger Prolaktininjektion läßt sich bereits erkennen, daß die Adenosintriphosphatase fast völlig aus den Drüsenepithelien verschwunden ist und nur das Sekret einen Gehalt an Adenosintriphosphatase aufweist. Dies wird noch deutlicher nach 6 Tagen Prolaktinzufuhr. Die abgeplatteten Alveolarwände sind reaktionslos, während die reichlich mit Sekret gefüllten Lumina das Gesamtbild beherrschen. Am 12. Tag der Behandlung ist eine starke Verengung der Drüsenendstücke mit erneutem Anstieg der Enzymaktivität eingetreten. Eine Alveolarlichtung ist fast nicht mehr zusehen. Allein die Gänge sind noch stark mit reaktivem Sekret gefüllt. Wenige, noch weitlumige Drüsenendstücke zeigen keinerlei Reaktion.

5. 5'-Nucleotidase

Gruppe 1 (Unbehandelte Kontrolltiere)

Ähnlich wie bei der Glucose-6-Phosphatase fällt hier bei den unbehandelten Tieren die bandförmige, dunkle Farbreaktion in der Basalzellschicht der Gänge und Drüsen auf. Die Zellkerne in diesem Bereich sind dunkel gefärbt. Die dem Lumen näher liegende Epithelschicht zeigt weniger Aktivität. Gefäße

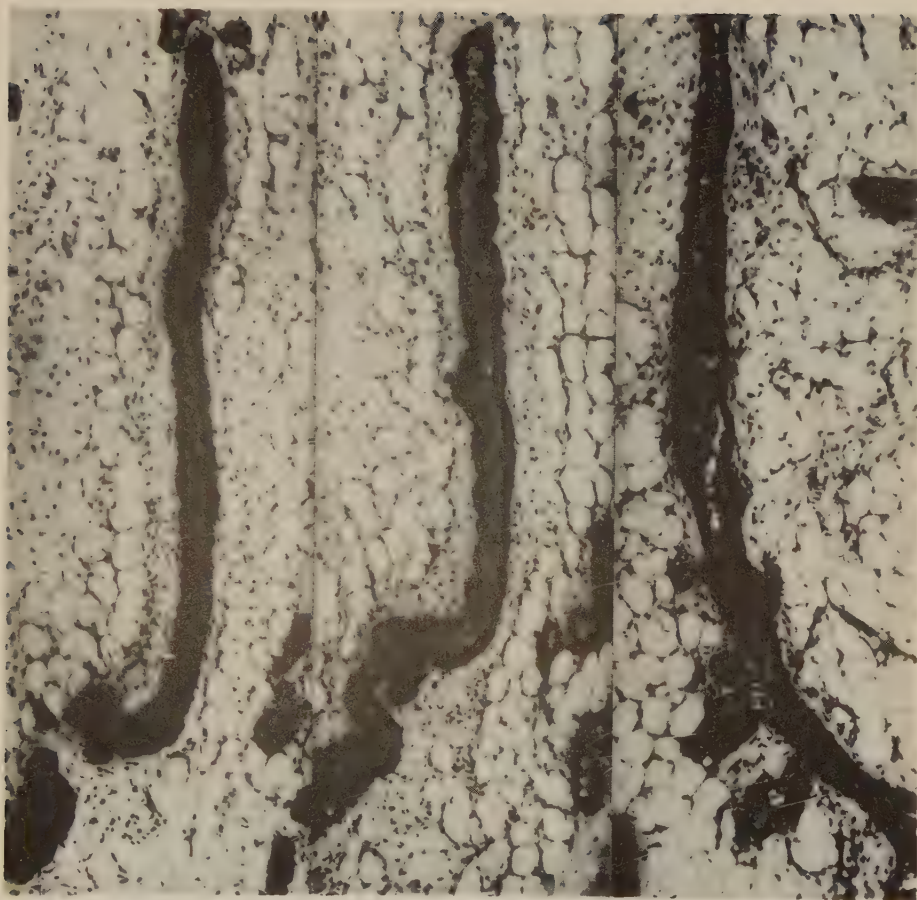


Abb.2 Unbehandelte Kontrolltiere (Gruppe 1):
Tubuläre Drüsenstruktur. Vergr. ca. 90 x

- a) Alkalische Phosphatase (Schwermetall-Simultan-Methode)
- b) Glucose-6-Phosphatase
- c) 5'-Nucleotidase

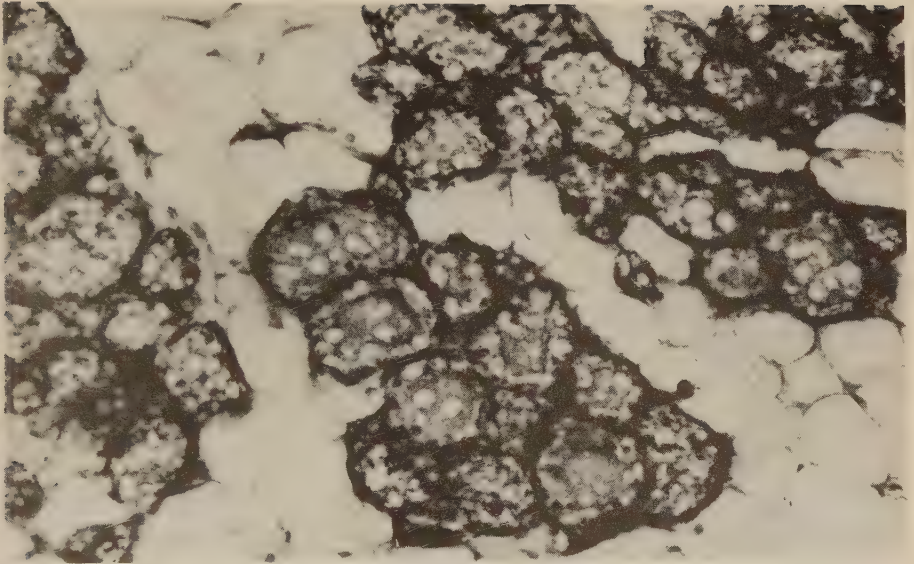


Abb. 3a Oestrogen, Progesteron 18 Tage, plus 3 Tage Prolaktin (Gruppe 3).
Basal gelegene, bandförmige Enzymaktivität. Vergr. ca. 250 x

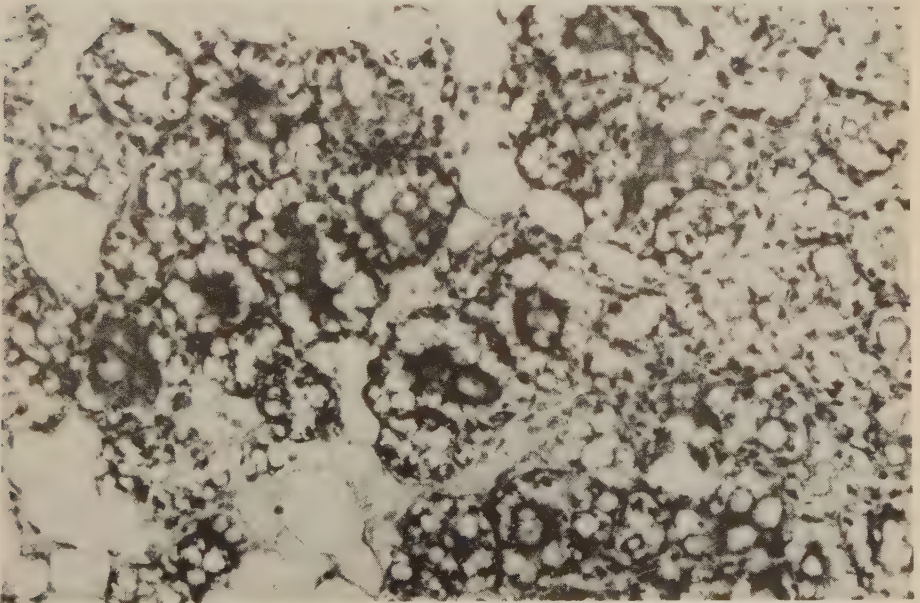


Abb. 3b Oestrogen, Progesteron 21 Tage, plus 6 Tage Prolaktin (Gruppe 3).
Unter weiteren Prolaktininjektionen Abnahme der Aktivität.
Vergr. 250 x

und Bindegewebe zeigen keine bis schwache Reaktion. Fettzellen und Nerven sind frei von spezifischen Reaktionen.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Eine genaue Lokalisation des Enzyms in der Brustdrüse vorbehandelter Tiere ist nicht möglich. Auch in den nächsten 12 Tagen weiterer Behandlung keine wesentliche Änderung. Man sieht einen der Basalmembran folgenden, hauchdünnen Farbniederschlag, der die Drüsenepithelien zum Teil miterfaßt. Eine Anfärbung der Kerne ist nicht mit Sicherheit feststellbar. Lediglich die intralobulär gelegenen Gänge lassen eine auffallend starke, basale Fermenttätigkeit erkennen. In den Hohlräumen vorhandenes Sekret hat sich dargestellt.

Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Die vorgenommenen Untersuchungen an drei verschiedenen Tagen lassen keinen sichtbaren Wandel des Enzyms unter der zusätzlichen Einwirkung von Prolaktin erkennen. Der Befund ist aus der Beschreibung der Gr. 2 ersichtlich.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Auch hier ist das enzymhistochemische Ergebnis nach den ersten sechs Tagen reiner Prolaktinzufuhr nahezu das gleiche wie am Ende der Vorbehandlungszeit. Lediglich eine intensive Anfärbung der Zellkerne und ein ebenso enzymaktives Sekret hat sich im Laufe dieser Tage entwickelt. Am 12.Tag dagegen hat sich das Bild gewandelt. Große, weite Alveolen mit Sekretresten sind ohne jegliche Aktivität, während stark verengte Drüsenendstücke teils kräftige, teils schwache Enzymaktivität zeigen.

6. Lactatdehydrogenase

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Der Ort der Enzymaktivität wird dargestellt durch punktförmige, blaue Formazanablagerungen, die die Mitochondrien markieren (WALKER, 1963). Letztere sind auch in den Fett enthaltenden Hohlräumen zu sehen, was auf eine mechanische Verteilung durch das Messer bei der Schnittführung zurückzuführen sein dürfte.

Ein positiver Reaktionsausfall ist im Bereich der Epithelien der Gänge und Drüsen-schläuche zu sehen. Gegen das Lumen zu wird an manchen Stellen ein dichtereres Auftreten der dargestellten Granula sichtbar. Auffallend stark enzymaktiv treten Bindegewebe und Gefäße hervor. Der Querschnitt durch eine mittlere Arterie zeigt eine stark positive Adventitia und eine reaktiv schwächere Media. Die Intima stellt sich nicht dar. Quergestreifte Muskulatur im gleichen Schnitt zeigt eine im Muskelbündel parallel verlaufende, perlschnur-artige Anordnung von gegeneinander scharf abgrenzbaren Reaktionsprodukten, die Mitochondrien entsprechen.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Die Brustdrüse, 15 Tage lang mit Steroidhormonen vorbehandelt, vermag im Vergleich zu den unbehandelten Tieren keine Unterschiede aufzuweisen. Lediglich die reiche Vermehrung des Drüsenepithels und der damit verbundenen relativ vermehrten Farbstoffablagerung läßt eine erhöhte Aktivität erscheinen. Auch während der zweiten Phase der Behandlung konnte an verschiedenen Versuchstagen keine Änderung der Enzym-Lokalisation und -Aktivität entdeckt werden.

Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Eine Änderung des Befundes im Vergleich zur Vorbehandlungsphase bzw. zu den vorhergehenden Gruppen ist nicht festzustellen.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Der histochemische Reaktionsausfall ist nach drei Prolaktininjektionen immer noch der gleiche wie er oben beschrieben wurde. Vom 6. - 12. Tag der Prolaktinbehandlung merkt man erstmals einen Rückgang der Enzymaktivität, bemerkbar an einem zahlenmäßigen Rückgang der Formazankristalle. Das Bindegewebe und die Gefäße zeigen dagegen weiterhin kräftige, spezifische Reaktion.

7. Succinodehydrogenase

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Der Reaktionsort ist gekennzeichnet durch Ablagerungen rundlicher Formazan-Kristalle, die die Mitochondrien markieren (RUDOLPH, 1960). Der größte

Teil der Farbstoffablagerungen ist exakt auf den Reaktionsort beschränkt. Wenige Kristalle sind außerhalb in Hohlräumen zu finden; es dürfte sich hierbei um Artefakte handeln. Keine bis schwache Enzymaktivität findet sich im Epithel der Ausführungsgänge und der Endstücke. Teilweise beobachtet man eine bevorzugte Ablagerung der Kristalle in den Epithelien entlang der Lichtung. Die Arterien zeigen wechselnde Aktivität, die Venen sind anscheinend reaktionslos. Das Bindegewebe, das die Fetttropfen umgibt, ist schwach positiv. Dagegen zeigt die quergestreifte Muskulatur im gleichen Präparat eine starke Aktivität in Form der oben beschriebenen perlschnurartigen Anordnung der Mitochondrien, woraus auch hervorgeht, daß eine ausreichende Reaktion stattgefunden hat.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Nach 15 Tage langer Oestrogen-Progesteron-Zufuhr findet man in den Epithelien der Drüsen und Gänge eine vermehrte Darstellung von hell-dunkelblauen Pünktchen. Eine Änderung der Enzymaktivität und Lokalisation innerhalb der folgenden 12-tägigen Behandlungszeit kann nicht beurteilt werden.

Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Ein Vergleich des Ergebnisses dieser Gruppe mit dem der Vorbehandlungsphase und dem der Gruppen 1 und 2 hat keine neuen Gesichtspunkte ergeben.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

In den ersten sechs Tagen beobachtet man noch im Bereich aller Epithelien gut gegeneinander abgrenzbare Granula, die jedoch nach dem 12.Tag nicht mehr in allen Drüsenepithelien nachweisbar sind. Wie schon bei den anderen Fermenten beschrieben, liegt bei einzelnen Läppchen der Drüse ein unterschiedlicher Funktionszustand vor. Deutlich fermentaktive Endstücke liegen dicht neben anderen, die nur mehr mäßige Reaktion aufweisen.

8. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Gruppe 1 (unbehandelte Kontrolltiere)

Ein der Lactatdehydrogenase ganz ähnliches Bild bietet die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. In den Epithelien der Ausführungsgänge und Endstücke ergibt sich eine gleichstarke Fermenttätigkeit, in Form von dicht gelagerten, punkt-

förmigen Granula. Auffallend kräftige Reaktion kann man im Bindegewebe und in den Gefäßen beobachten. Die Farbstoffablagerungen in den Hohlräumen sind als Artefakte anzusehen. In der quergestreiften Muskulatur ist das Enzym eindeutig nachweisbar.

Gruppe 2 (Oestrogen/Progesteron 12 Tg.)

Am Ende der Vorbehandlungszeit zeigt der histochemische Reaktionsausfall des Fermentes keinerlei Unterschied zu dem der Gruppe 1. Lediglich die reichliche Vermehrung des Drüsenepithels, wie man es bei der Lactatdehydrogenase sehen konnte, läßt einen relativen Aktivitätsanstieg in der Brustdrüse erkennen. Auch unter der folgenden Behandlung bis zum 12.Tag ist kein unterschiedlicher Ausfall zu beobachten.

Gruppe 3 (Oestrogen/Progesteron/Prolaktin 12 Tg.)

Sowohl am Ende der 15-tägigen Vorbehandlung als auch am 3.Tag der dreifach kombinierten Behandlung erkennt man wie in Gruppen 1 und 2 eine dichte Lagerung der Granula im Bereich des Epithels, der Drüsen und Gänge. Nach dem 12.Tag der Injektionen zeigt sich unter gleicher Versuchsanordnung eine Auflockerung in der Dichte der dunkelblauen Granula. Gefäße und Bindegewebe weisen noch immer kräftige Farbreaktionen auf.

Gruppe 4 (Prolaktin 12 Tg.)

Nach dreimaliger Prolaktingabe ist in dem Epithel noch der gleiche Aktivitätsgrad zu sehen, wie er am Ende der Vorbehandlungszeit herrschte. Im Verlaufe der letzten sechs Tage ist dann ein deutlicher Rückgang der kristallinen Darbstoffablagerungen zu verzeichnen, der stärkeren Ausmaßes ist als der in Gruppe 3. Die histochemische Reaktion der Gefäße und des Bindegewebes ist unverändert stark.

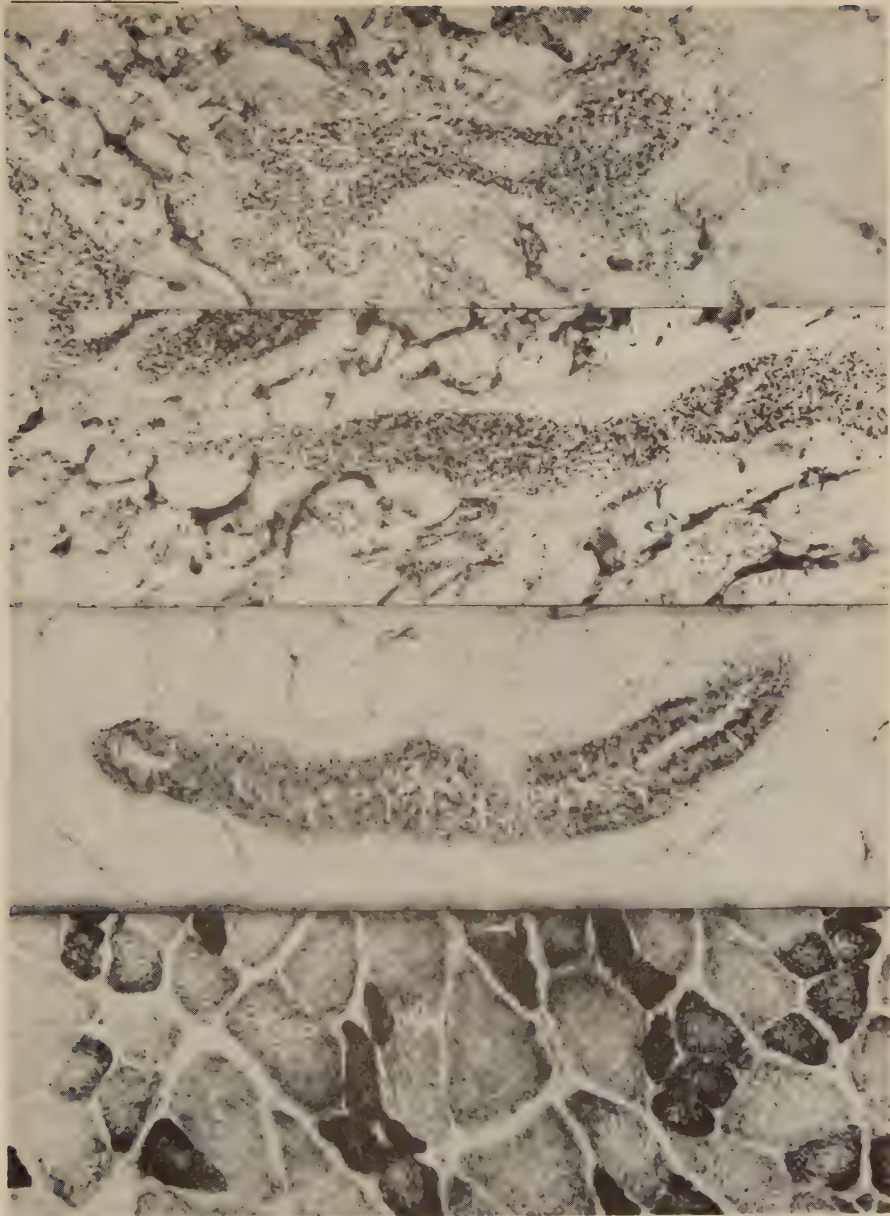


Abb.4 Unbehandelte Kontrolltiere (Gruppe 1). Tubuläre Struktur,
a) Lactatdehydrogenase. Vergr. ca. 250 x
b) Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Vergr. ca. 250 x
c) Succinodehydrogenase. Vergr. ca. 250 x
d) Succinodehydrogenase, quergestreifte Muskulatur, Perlschnurartige
Anordnung der Mitochondrien. Vergr. ca. 250 x

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE ^{†)}

Die Aussagekraft von enzymtopischen Befunden ist stets kritisch zu beurteilen. Besonders angebracht ist dies bei der Betrachtung der Farbintensitätsänderung, die schwer zu objektivieren ist. Die vielen Unsicherheitsfaktoren zwingen zu großer Zurückhaltung. Unter anderem die verschiedene Schnittdicke, die gerade beim Gefrierschnitt häufiger vorkommt, die verschiedenen Inkubationsbedingungen beim Ablauf der Reaktionen. Nicht zuletzt reagieren Gewebe von Versuchstieren, selbst der gleichen Zucht entstammend, oft unterschiedlich stark.

In unseren Versuchen verwendeten wir Prolaktin, um künstlich bei oophorektomierten Tieren einen laktationsähnlichen Zustand zu erzeugen. Nach MUNDINGER (1967) löst das Hormon, in den eosinophilen Zellen der Hypophyse gebildet, drei Reaktionen aus, das aber nur im Zusammenspiel mit anderen Sekreten der Hypophyse, der Nebennieren und den Gonaden.

1. Es fördert die Ausbildung der Brustdrüse.
2. Es aktiviert und erhält in der Stillperiode die Milchbildung.
3. Es hat Einfluß auf die Progesteronbildung im Corpus luteum.

LYONS (1942) war der erste, der die lokale Wirkung des Prolaktins aufzeigen konnte. Prolaktin wurde bei Kaninchen intraduktal appliziert, so daß sich nur ein bestimmter Drüsensektor entwickeln konnte. Weiter wurde von MIZUNO und NAITO (1956) anhand des Nukleinsäuregehaltes der Mamma die lokale Einwirkung des Prolaktins untersucht. CHADWICK (1962) bewies am Anstieg der Lactose-Synthese durch intraduktale Injektionen die lokale Wirksamkeit. TRAURIG und MORGAN (1964) haben an kastrierten weiblichen Tieren ebenfalls festgestellt, daß Prolaktin eine Mamma-Epithel-Proliferation ebensogut wie eine alveoläre Läppchen-Differenzierung hervorruft.

Der Reiz des Saugens führt zu einer nervös ausgelösten gleichzeitigen Bildung von Oxytocin im Hypothalamus, ein Hormon, das nicht nur die Ausstoßung von Milch aus den Drüsengängen fördert, sondern wahrscheinlich auch die Prolaktin-Sekretion in der Hypophyse stimuliert und so eine vermehrte Ausscheidung der für die Laktation erforderlichen Hormone anregt (MUNDINGER, 1967).

^{†)} Herrn Professor Dr. K.H.Bässler, Physiol.-chem.Institut der Universität Mainz, sei für sachkundige Beratungen vielmals gedankt.

Abgesehen von den Kontrolltieren, die histologisch nur tubuläre Strukturen an der Drüse aufweisen, zeigt die 1. Gruppe am 15. Tag der Behandlung das Bild einer voll entwickelten Brustdrüse. Nach den Untersuchungen von KIRKHAM und TURNER (1954) ist vom 20. Tag der Oestrogen-Progesteron-Zufuhr an mit keinem weiteren Anstieg der Desoxyribo-nucleinsäure zu rechnen. Beide Hormone rufen bei gleichzeitiger Zufuhr einen der Entwicklung in der Gravidität vergleichbaren Zustand der Milchdrüse hervor. Während wir am 18. Tag der Behandlung ein Maximum der Mammaentwicklung erreicht haben, ist vom 21. - 27. Tag ein Stillstand des Wachstums zu beobachten. Eine leichte Sekretion ist vom 15. Tag an sichtbar. Einen deutlichen Unterschied dazu zeigen die Gruppen 3 und 4, die vom 15. Tag an Prolaktin zusätzlich oder allein bekamen. Besonders die Tiere der Gruppe 4 zeigen das Bild einer laktierenden Mamma mit weiten Alveolen, gefüllt mit homogenem, eosinophilem Sekret. Das Epithel und die Kerne liegen abgeflacht eng an der Wand der Alveole. Bei Gruppe 3 ist der Durchmesser der Alveolen kleiner, das Epithel kubisch. Die Sekretion ist etwas geringer. Ähnliche Untersuchungen wurden von MEITES und SGOURIS (1952) vorgenommen. Sie zeigten, daß Prolaktin an der Milchdrüse der Kaninchen eine Sekretion hervorrief, aber durch gleichzeitige Gaben von Progesteron und Oestrogen, in der Dosierung, wie sie für die Entwicklung der Drüse nötig ist, den Effekt des Prolaktins hemmen konnten. MEITES und SGOURIS (1954) wiesen in erneuten Versuchen darauf hin, daß der Antagonismus zwischen Oestrogen und Progesteron einerseits und Prolaktin andererseits relativ ist, und daß er durch Erhöhung der Dosis von Prolaktin und Erniedrigung der der Steroide überwunden werden kann. LEINZINGER (1953) wies in seinen Versuchen am Meerschweinchen den alleinig hemmenden Effekt von Oestrogen nach. Er bezog die Wirksamkeit auf den direkten Einfluß des Hormons auf das Milchdrüsenparenchym. Später war man mehr der Ansicht, daß Oestrogen und Progesteron zusammen die Laktation hemmten (LABHART, 1967). Da nach den neuesten Untersuchungen das Prolaktin Einfluß auf die Progesteronbildung im Corpus luteum hat, dürfte diese Einwirkung hemmenden Charakters sein.

Der Sicherheit, mit der man verschiedene Enzyme in der Brustdrüse lokalisieren kann, stehen Schwierigkeiten der Deutung dieser fermenthistochemischen Befunde gegenüber. Die Ergebnisse der bisher in der Literatur mitgeteilten Untersuchungen über die alkalische Phosphatase sind unterschiedlich.

Alkalische Phosphatase:

DEMPSEY, BUNTING und WISLOCKI (1947) fanden das Enzym in den Endothelzellen, Epithelien und in den Myoepithelien der Gänge und Drüsen. Gegen Ende der Gravidität und Beginn der Laktation beobachteten sie einen Rückgang der Aktivität der Myoepithelien und eine gleichzeitig vermehrte Darstellung der Gefäßendothelien. VERNE (1951), HOLMES (1956) und BRETHFELD (1966) konnten diese Angaben in Versuchen jedoch nicht bestätigen.

Mit der Azofarbstoffmethode beobachteten wir, unter der Einwirkung von Prolaktin, und zwar nur bei den Tieren, die Oestrogen und Progesteron zusätzlich bekamen, am Höhepunkt des Sekretionszustandes, einen Rückgang der Enzymaktivität der Myoepithelien und eine vermehrte Darstellung des Kapillarbettes. Bei den Tieren, die nur Prolaktin vom 15. Tag an bekamen, ist keine erhöhte Aktivität in den Kapillaren festzustellen, aber ebenso ein Rückgang in der Darstellung myoepithelialer Zellen. Unter der reinen Oestrogen-Progesteron-Behandlung weisen die Korbzellen deutliche Enzymaktivität auf, die gegen Ende des Versuches abnimmt. Die unbehandelten Tiere zeigen eine gleich starke Reaktion ihrer tubulären Strukturen.

Eine Abhängigkeit der alkalischen Phosphatase vom Oestrogen fand PERRINI (1953). Unter der Einwirkung dieses Hormons beobachtete er einen Anstieg der Enzymtätigkeit. Zu der gleichen Feststellung kam WANDREY (1961). Auch DRENNAN (1952) stellte bei gutartigen Veränderungen der Brustdrüse eine Abhängigkeit der alkalischen Phosphatase von der endokrinen Aktivität fest. Die Brustdrüse der Patienten nach der Menopause wies einen geringeren Enzymgehalt auf als die von jungen Patienten.

Mit der Schwermetall-Simultan-Methode stellen wir fest, daß das Enzym während der Zeit der Oestrogen-Progesteron-Behandlung in stetem Gleichmaß vorhanden ist. Bei Gruppen 3 und 4 zeigt sich am 6. Tag ein deutlicher Abfall der Aktivität, die gegen Ende der Behandlung wieder bei beiden Gruppen zuzunehmen scheint. Eine vermehrte Darstellung der Gefäße ist nicht zu sehen. FOLLEY und GREENBAUM (1947) zeigen in ihren Versuchen mit der alkalischen Phosphatase einen Anstieg gegen Ende der Tragzeit mit gleichbleibender Aktivität während der Laktation und einen Abfall in der Involution.

Die unterschiedlichen Ergebnisse dürften auf die verschiedenen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Die angeführten Autoren verwendeten normal entwickelte Tiere, wobei es zu einer regelmäßigen Entleerung der Brustdrüse durch die Jungen kam. Bei den von uns verwendeten Tieren entwickelte sich

unter den laufenden Injektionen eine starke Sekretion, die bald zu einer Stauung ohne Abflußmöglichkeiten führte. Die Drüsenalveolen werden stark ektatisch, die Septen zerreißen und bilden so vergrößerte sekrethaltige Räume. Auch BRETHFELD (1966) stellt eine stärkere Auflösung des Epithels mit fehlender Aktivität der alkalischen Phosphatase in seiner experimentell erzeugten Milchstauung fest.

Glucose-6-Phosphatase:

DeDUVE und Mitarbeiter (1949) und SWANSON (1950) bestätigten durch Untersuchungen die Existenz eines spezifischen Enzyms Glucose-6-Phosphat. CORI (1953) vermutet, daß die Glucose-6-Phosphatase die Aufnahme der Glucose in die Zelle begünstigt.

Auch unspezifische Phosphomonoesterasen sind zur Spaltung von Glucose-6-Phosphat imstande. Jedoch erlaubt die Eigenschaft dieses spezifischen Fermentes eine Unterscheidung von anderen unspezifischen Enzymen. So liegt das pH-Optimum bei ca. 6,5, in einem Bereich also, in welchem weder die alkalische noch die saure Phosphatase aktiv sind (HERS und DeDUVE, 1950). Von CHIQUOINE (1953) wurde eine Methode zur histochemischen Lokalisation des Enzyms entwickelt.

Wir stellen fest, daß die Glucose-6-Phosphatase am Ende der Prolaktinbehandlung bei Gruppen 3 und 4 eine Abnahme der Aktivität erfährt. Bei den rein mit Oestrogen-Progesteron behandelten Tieren ist das Enzym gleichmäßig als bandförmiger, basaler Streifen vorhanden. Gleichermaßen starke Aktivität zeigen die Epithelschläuche und Knospen der unbehandelten Tiere.

Enzymhistochemische Untersuchungen an der Mamma über Glucose-6-Phosphatase liegen bisher nicht vor.

Adenosintriphosphatase:

Die Adenylpyrophosphatasen, wie sie auch häufig genannt werden, spalten endständige Orthophosphatgruppen aus Adenosintriphosphat oder aus Inosintriphosphat ab (BALDWIN, 1952; SUMNER und SOMERS, 1953). Adenosintriphosphatasen finden sich in Muskelfibrillen, in den Mitochondrien sämtlicher Zellen, Erythrozyten (GARZO und Mitarb., 1952). Von den biologischen Funktionen ist am besten die Rolle der Myosin-Adenosintriphosphatase sowie der Adenosintriphosphatase bei Säugetieren erforscht. Ihr pH-Optimum sowie

ihre Reaktion auf Aktivatoren und Inhibitoren hängen von der Herkunft des Enzyms ab. Zum Beispiel hat die Myosin-Adenosintriphosphatase ein pH-Optimum von 9 und höher. Sie wird durch Mg^{++} gehemmt und Ca^{++} aktiviert (NEEDHAM, 1952). Im Gegensatz dazu hat die Adenosintriphosphatase in den Mitochondrien der Muskelfasern ein pH-Optimum von etwa 7,0 und wird durch Mg^{++} aktiviert und Ca^{++} gehemmt (KITTYAKARA und HARMAN, 1953).

Bei unseren Untersuchungen konnten wir keine Adenosintriphosphatase-Aktivität in quergestreifter Muskulatur finden, obwohl die Inkubationsbedingungen für die Adenosintriphosphatase in den Mitochondrien vorhanden waren.

Eine Erklärung hierfür dürfte nach LINDBERG und ERNSTER (1954) sein, daß die Aktivität der Adenosintriphosphatase in dem Mitochondrium erst nach einer Schädigung dieser Organzellen durch mechanische Kräfte, z.B. Einfrieren und Auftauen, nachweisbar ist.

Die Enzymaktivität in den Drüsenepithelien kommt folgendermaßen zum Ausdruck: Bei den Kontrolltieren und der Gruppe 2 besteht eine gleichermaßen starke Aktivität, während unter der Prolaktinbehandlung der Gruppen 3 und 4 am 3. - 6. Tag ein Abfall der Enzymaktivität zu verzeichnen ist, die gegen Ende der Behandlung wieder ansteigt. Gefäße und Nerven zeigen eine vergleichsweise stärkere Aktivität.

5'-Nucleotidase:

Die weite Verbreitung der spezifischen 5'-Nucleotidase im tierischen Gewebe wies REIS (1951) nach. Das Enzym findet sich vor allem im Herzmuskel, Nervengewebe, Schilddrüse und in der Wand der Aorta. Als Substrate werden Adenosin-5-phosphat (Muskeladenylsäure) sowie Inosin-5-phosphat angegriffen.

In unseren Versuchen sehen wir bei den unbehandelten Tieren eine betont basale Aktivität der Epithelien, was unter der Oestrogen-Progesteron-Behandlung nicht mehr deutlich erkennbar ist. In den ersten Tagen der Prolaktinbehandlung bei Gruppen 3 und 4 ist keine Änderung der Enzymtätigkeit festzustellen. Erst am 12. Tag ist ein deutlicher Rückgang nachweisbar. Untersuchungen an der Mamma über 5'-Nucleotidase liegen bisher nicht vor.

Lactatdehydrogenase:

Der Ort der Enzymaktivität wird dargestellt durch granuläre Formazanablagerungen im Cytoplasma der Epithelzellen. Obgleich aus morphologischer Sicht der Gedanke naheliegt, daß diese Reaktionsprodukte in Mitochondrien lokalisiert sind (WALKER, 1963), findet die Lactatbildung nach übereinstimmenden biochemischen Befunden jedoch im Zellplasma statt (RAPOPORT, 1962). Ob die Formazankristalle als Indikatoren eine topische Beziehung zu präformierten Zellorganzellen haben, ist durch bisherige elektronenoptische und histochemische Untersuchungen nicht entschieden.

Isoliertes Mammagewebe ist fähig, aus Glucose Milchsäure herzustellen, was ein Beweis dafür sein dürfte, daß die Glucose ein glycolytischer Stoffwechselweg in der Brustdrüse existiert (TURNER, 1952). Die Ergebnisse von experimentellen Isotopenarbeiten an intakten Tieren und an isolierten Brustdrüsenpräparaten machen das Vorliegen eines Glycolyse-Weges wahrscheinlich (ABRAHAM und Mitarb., 1954; BLACK und Mitarb., 1957).

Eine Untersuchung über die Lactatdehydrogenase an der Mamma stammt von HERSHEY und Mitarb. (1963). Er stellt bei Mäusen während der Laktationsperiode einen Anstieg der Lactatdehydrogenase fest.

In unseren Versuchen finden wir eine gleichstarke Enzymaktivität in den Gruppen 1, 2 und 3, die sich im Verlauf der Behandlung bezüglich der Vermehrung in den Epithelien nicht sicher beurteilen läßt. Bei Gruppe 4 konnte ein deutlicher Rückgang der Aktivität vom 6. Tag der Prolaktinzufuhr an beobachtet werden. Das Bindegewebe und die Gefäße zeigten während der ganzen Zeit in allen Gruppen eine stark spezifische Reaktion. Das Enzym wurde in quergestreifter Muskulatur ebenfalls nachgewiesen.

Succinodehydrogenase:

Eine große Bedeutung im Zellstoffwechsel hat die Succinodehydrogenase, ein absolut substratspezifisches Ferment, das die reversible Oxydation von Bernsteinsäure zu Fumarsäure katalysiert und vom Zitronensäurezyklus Wasserstoff auf das Cytochrom-System überträgt. Sie findet sich fast universell in Pflanzen, tierischen Geweben und Mikroorganismen (NEUFELD u. Mitarb., 1954).

Nach den Untersuchungen von MOORE und NELSON (1952), SMITH und RICHTERLICH (1958) am Brustdrüsenhomogenat erfährt die Succinodehydrogenase-Aktivität einen steilen Anstieg am Ende der Gravidität, bleibt auf der gleichen

Höhe während der Laktation und sinkt dann in der Involutionsphase auf Werte in der frühen Gravidität zurück. Die Steigerung der Enzymaktivität wird durch erhöhte Energiemobilisation erklärt. Der Reaktionsort in den Epithelien ist gekennzeichnet durch rundliche Formazankristalle, die die Mitochondrien darstellen (WALKER, 1963; RUDOLPH, 1960).

Wir beobachten eine schwache Aktivität in den Epithelien der unbehandelten Tiere, wobei aber gleichzeitig eine starke Aktivität seitens der quergestreiften Muskulatur zu sehen ist. Erst unter Oestrogen-Progesteron- und Prolaktin-Behandlung ist zahlenmäßig eine deutliche Zunahme der Mitochondrien festzustellen. Unter den weiteren Hormoninjektionen ist in keiner Gruppe objektiv eine Änderung der Fermenttätigkeit festzustellen. Bei Gruppen 3 und 4 ist am 12. Tag ein deutlicher gebietsweiser Rückgang in den Drüsenläppchen zu sehen.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase:

Innerhalb 24 Stunden nach der Geburt erfolgen in der Brustdrüse Veränderungen aller Stoffwechselvorgänge. Es kommt zu weitgehenden Umschaltungen im Zwischenstoffwechsel. Der Kohlenhydratabbau wird vom Emden-Meyerhof-Weg zum oxydativen Pentoseabbau umgelenkt, wie durch Isotopenversuche belegt werden konnte. Ein Kennzeichen hierfür ist die Aktivitätserhöhung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die annähernd auf das Hundertfache ansteigt (GLOCK und McLEAN, 1954). Dieser Stoffwechselweg der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase stellt einen Nebenweg dar. Er dürfte in allen Zellen durch die Bildung von Pentosen eine wichtige Rolle bei der Nucleinsäuresynthese spielen. Dieser Weg ist besonders in der Mamma ausgeprägt, was vermutlich mit der aktiven Synthese von Fettsäuren in Zusammenhang steht. Nach den damaligen Untersuchungen soll diese Umschaltung unter dem Einfluß von Prolaktin erfolgen, was auch in vitro nachweisbar ist. Ein Zusatz von Prolaktin zu Gewebsschnitten aus der Milchdrüse bewirkt eine Erhöhung des oxydativen Pentosewegs (RAPOPORT, 1962).

In den Untersuchungen am Homogenat von GLOCK und McLEAN (1954) ist ebenfalls ein Anstieg der Glucose-6-Dehydrogenase auf das 60-Fache während der Zeit vom Ende der Tragzeit bis zum Ende der Laktation nachgewiesen worden. Dieser Anstieg wird mit der Milchsekretion in Zusammenhang gebracht, nicht mit dem Wachstum, denn FOLLEY und GREENBAUM (1947) haben festgestellt, daß sich mit Berücksichtigung der Schwankungen des Milchgehaltes das Gewicht der Drüse bei der Ratte während der Laktation

nicht ändert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß ein Zusammenhang zwischen den Enzymen des Pentoseweges und den Sekretionsvorgängen besteht (Fettsynthese, Proteinsynthese). Bei einer vergleichenden Bewertung der Enzymaktivität in der juvenilen und in der hormonal stimulierten Mamma ist nach den Untersuchungsergebnissen von PAEK (1967) eine eindeutige Intensitätszunahme der histochemischen Enzymnachweise festzustellen. Diese Beobachtungen lassen sich auch elektronenmikroskopischen Befunden zuordnen, durch die ein gradueller Umbau der Drüsenzelle mit intensiver Fettsynthese und Sekretion morphologisch nachgewiesen werden kann. Unter dem Einfluß von Prolaktin war keine weitere Vermehrung der Enzymaktivität in den Epithelzellen erkennbar. Daraus ist im Hinblick auf die genannten Studien und im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen, daß in der Mamma eine qualitative enzymatische Stabilität zu bestehen scheint, die durch die wirkenden Geschlechtshormone induziert und erhalten wird.

Infolge des Sekretionsimpulses durch Prolaktin entstehen in den Drüsenalveolen Stauungszustände des Sekrets und damit Reaktionen, die einer abrupten Unterbrechung der Sekretabnahme einer laktierenden Milchdrüse ähneln. In diesen Phasen einer Milchstauung werden die Epithelzellen weitgehend geschädigt, es kommt schließlich zur Cytolyse und Auflösung der Zellorganellen (BÄSSLER, 1961). Diesen Beobachtungen entspricht der Abfall der Enzymaktivität in der 3. und 4. Gruppe, bei denen das gebildete Sekret nicht abgesaugt und in den Drüsenläppchen retiniert wird. Dadurch treten Veränderungen auf, die einer Milchstauung mit nachfolgender Destruktion des Epithelverbandes entsprechen und deren Wandel im enzymhistochemischen Bild aufgezeigt werden konnte.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In bisherigen überwiegend biochemischen Untersuchungen sind in Gewebshomogenaten zahlreiche den Stoffwechsel der Milchdrüse beeinflussende Enzyme nachgewiesen worden. Im Vordergrund dieser Studien stand naturgemäß das Verhalten der Enzyme während der Laktation bei verschiedenen Spezies.

Dagegen liegen über enzymhistochemische Befunde nur vereinzelte Beobachtungen vor, die sich fast ausschließlich mit dem Nachweis von Phosphatasen befassen. Ein breiteres enzymhistochemisches Spektrum liegt von den Geschwülsten der menschlichen Brustdrüse vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist in Ergänzung vorangegangener Untersuchungen an der Mamma das histochemische Enzymmuster unter dem Einfluß von Oestrogen, Progesteron und vor allem unter Prolaktin aufzuzeigen. In Versuchen an 42 weiblichen Ratten werden Lokalisation und Intensitätsgrad folgender Enzymnachweismethoden bestimmt:

1. Phosphatasen (Alkalische Phosphatase, Glucose-6-Phosphatase, Adenosin-triphosphatase, 5'-Nucleotidase):

Unter dem Einfluß von Oestrogen, Progesteron und Prolaktin sind in den Epithelzellen diese Enzyme in annähernd gleicher Weise und Intensität nachweisbar. Man kann daraus eine gewisse Stabilität dieser Reaktionen in der Epithelzelle der Mamma ablesen. Unter dem Einfluß von Prolaktin setzt eine Sekretion ein, die nicht mit einer wesentlichen Änderung des histochemisch erfaßbaren Enzymmusters verbunden ist.

2. Dehydrogenasen (Lactatdehydrogenase, Succinodehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase):

Die Dehydrogenasen, dargestellt durch punktförmige Formazan-Kristallablagerungen zeigten einen ähnlichen Ablauf ihrer Reaktionen im Epithel der Drüsen und Gänge. Die Sekrete weisen keine spezifische Färbung auf.

Die Abnahme der Enzymaktivitäten am Ende der hormonellen Behandlung erklären wir durch Stauungszustände in den Drüsenalveolen, die zu einer Cytolyse führen. Die enzymhistochemischen Ergebnisse des einzelnen Fermentes wurden diskutiert und biochemischen Beobachtungen an Gewebshomogenaten der Milchdrüse gegenübergestellt.

LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM, S., P.F. HIRSCH and CHAIKOFF:

The quantitative significance of glycolysis and non-glycolysis in glucose utilization by rat mammary gland.

J. Biol. Chem. Baltimore 211, 31-38 (1954)

ANDRES, A.G. and B.A. MILINOW:

Alkaline glycerophosphatase in cancer, praecancerous modification and benign tumors of the breast.

Arch. Path. 13, 39-46 (1951)

BÄSSLER, R.:

Elektronenoptische Beobachtungen bei experimenteller Milchstauung.

Frankf. Zschr. Path. 71, 398-422 (1961)

BALDWIN, E.:

Dynamic aspects of biochemistry.

Ed. 2. Cambridge Univ. Press, London, 1952

BLACK, A.L. and M. KLEIBER:

The tricarboxylic acid cycle as a pathway for transfer of carbon from acetate to amino acids in the intact cow.

Biochim. biophysica acta, N.Y. 23, 59-69 (1957)

BREDTHFELD, V.:

Enzymhistochemische Studien an der Milchdrüse.

Med. Diss. Mainz 1966

CHADWICK, A.:

The onset of lactose synthesis after injection of prolactin.

Biochem. J., London, 85, 554-558 (1962)

CHIQUEINE, A.D.:

The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse.

J. Histochem. Cytochem. 1, 429-435 (1953)

CORI, G.T.:

Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease.

Harvey Lect. 48, 145-171 (1953)

DeDUVE, C., J.BERTHET, H.G.HERS et L.DUPRET:

La système hexosephosphatasique. I. Existence d'une glucose-6-phosphatase dans le foie.

Bull.Soc.Chim.biol. Paris 31, 1242-1253 (1949)

v.DEIMLING, O.H.:

Die Darstellung phosphatfreisetzender Enzyme mittels Schwermetall-Simultan-Methoden.

Histochemie 4, 48-55 (1964)

DEMPSEY, E.W., H.BUNTING and G.B.WISLOCKI:

Observations on the chemical cytology of the mammary gland.

Am.J.Anat. 81, 309-334 (1947)

DRENNAN, J.M.:

Alkaline phosphatase in breast carcinom.

Brit.J.Surg. 39, 458-461 (1952)

FANGER, H. and B.BARKER:

Histochemistry of breast diseases.

A.M.A.Arch.Path. 67, 293-305 (1959)

FANGER, H. and B.BARKER:

Capillaries of normal and diseased breast.

A.M.A.Arch.Path. 69, 67-76 (1960)

FOLLEY, S.J. and J.D.KAY:

The alkaline phosphomonoesterase of the mammary gland.

Biochem.J. 19, 1837-1850 (1935)

FOLLEY, S.J. and A.L.GREENBAUM:

Changes in the arginase and alkaline phosphatase-contents of the mammary gland and liver of the rat during pregnancy, lactation and mammary involution.

Biochem.J. London, 41, 261-269

FORAKER, A.G.:

A histochemical study of breast carcinoma.

Surg.Gynec.Obstetr. (Chicago), 102, 1-8 (1956)

GARZO, T., A.ULLMANN und F.B.STRAUB:

Die Adenosintriphosphatase der roten Blutkörperchen.

Acta physiol.Acad.Sci.hung. 3, 513-524 (1952)

GLOCK, G.E. and P.McLEAN:

Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumors.

Biochem.J. London, 56, 171-175 (1954)

GLÜCK, E.:

Les phosphomonoestérases des néoformations mammaires.

Acta path.microbiol.scand. Suppl. 93, 106-120 (1952)

GÖSSNER, W.:

Histochemischer Nachweis hydrolytischer Fermente mit Hilfe der Azofarbstoffmethoden.

Zschr.Zellforsch. (Berlin) 1, 48-97 (1959)

GOMORI, G.:

Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections.

Proc.Soc.Exper.Biol.Med., N.Y. 42, 23-26 (1939)

GOMORI, G.:

Histochemistry of esterases.

Intern.Rev.Cytol. 1, 323-335 (1952)

GRANT, G. A.:

The metabolism of galactose II.

Biochem.J., London 29, 1905-1909 (1935)

GREENSTEIN, J.P.:

Distribution of acid and alkaline phosphatase in tumors, normal tissues and the tissues of tumor-bearing rats and mice.

J.Nat.Cancer Inst., Wash. 2, 511-524 (1942)

HARD, W.L., PRATT-THOMAS, H.R. and M.BELKIN:

The distribution of phosphatases in human and mouse tumors.

S.Dakota J.Med.Pharmacy 1, 154-160 (1948)

HAYASHI, M., H.SIMODA et al.:

Histochemistry of enzymes in carcinoma of the mammary gland, uterus and prostate.

Kumamoto Med.J. 7, 114-124 (1955)

HERS, H.G. and C.DeDUVE:

II. Répartition de l'activité glucose-6-phosphatasique dans les tissues.

Bull.Soc.Chim.biol., Paris 32, 20-30 (1950)

HERSHEY, B.F., LEWIS, C. and al.:

Phosphopyridine nucleotide linked dehydrogenases, aldolase and fumarase in mouse breast.

J.Histochem.Cytochem. 11, 224-231 (1963)

HOLMES, R.:

Alkaline phosphatase in the rabbit mammary gland.

Nature 178, 311-312 (1956)

HOLZNER, J.H. und F.KAUFMANN:

Histochemische Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen bei der cystischen Mastopathie, beim Fibroadenom und Carcinom der menschlichen Brustdrüse.

Krebsarzt, Wien, 3, 185-192 (1965)

HOPKINS, T.R. and R.D.COLE:

A comparison of the effects of hormones upon β -glucuronidase and alkaline phosphates activities in mammary gland and liver.

Endocrinology 70, 606-607 (1962)

KABAT, K. and J.FURTH:

A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues.

Amer.J.Path. 17, 303-318 (1941)

KARLSON, P.:

Biochemische Wirkungsweise der Hormone.

Dtsch.med.Wschr. 86, 668-672 (1960)

KARLSON, P.:

Mechanisms of hormone action.

Thieme, Stuttgart 1965

KIRKHAM, W.R. and C.W.TURNER:

Induction of mammary growth in rats bei estrogen and progesterone.

Proc.Soc.Exper.Biol. N.Y. 87, 139-141 (1954)

KITIYAKARA, A. and J.W.HARMAN:

The cytological distribution in pigeon sceletal muscle of enzymes acting on phosphorylated nucleotides.

J.Exper.Med. (New York) 97, 553-572

KON, S.K. and A.T. COWIE:

Milk: the mammary gland and its secretion I.

Academic Press N.Y. and London, 1961

KRAUT, H. und Ä. WEISCHER:

Esterasen. In: Physiol. Chemie, Lehr- und Handbuch, Bd. I, 1070-1100,

1951. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951

LABHART, A.:

Klinik der inneren Sekretion, 635-638, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957

LEINZINGER, E.:

Tierexperimentelle Studien zur hormonalen Steuerung der Milchdrüse.

Zschr. Geburtsh., Stuttgart 138, 306-325 (1953)

LINDBERG, O., and L. ERNSTER:

Chemistry and physiology of mitochondria and microsomes. Protoplasmatologia, Handb. Protoplasmaforsch., Bd. III, A, 4. Springer, Wien 1954

LYONS, W.R.:

The direct mammatrophic action of lactogenic hormone.

Proc. Soc. Exper. Biol. N.Y. 51, 308-311 (1942)

MANHEIMER, L.H. and A.M. SELIGMAN:

Improvement in the method for the histochemical demonstration of alkaline phosphatase and its use in a study of normal and neoplastic tissues.

J. Nat. Cancer Inst. Wash. 9, 181-199 (1948)

MEITES, J. and J.T. SGOURIS:

Can the ovarian hormones inhibit the mammary response to the prolactin?

Endocrinology 53, 17-23 (1953)

MEITES, J. and J.T. SGOURIS:

Effects of altering the balance between prolactin and ovarian hormones on initiation of lactation in rabbits.

Endocrinology 55, 530-534 (1954)

MELNICK, P.J. and K. BULLOCK:

Histochemical studies on breast neoplasm.

Amer. J. Path. 35, 706-707 (1959)

MIZUNO, H. and M. NAITO:

The effect of locally administered prolactin of the nucleic acid content of the mammary gland of the rabbit.

Endocr. Jap., 3, 227-230 (1956)

MONIS, B., M. M. NACHLAS and A. M. SELIGMAN:

Histochemical study of 3-dehydrogenase systems in human tumors.

Cancer 12, 1238-1247 (1959)

MONIS, B. and A. M. RUTENBERG:

Alkaline phosphatase activity in neoplastic and inflammatory tissues of man.

Cancer 13, 538-544 (1960)

MOORE, R. O. and W. L. NELSON:

Some oxidative enzyme systems of mammary gland tissue.

Arch. Biochem. Biophys. 36, 178 (1952)

MUNDINGER, F.:

Anatomie und Funktion des Hypophysensystems. In: Hypophysentumoren, Hypophysektomie.

Thieme-Verlag, Stuttgart 1967

NACHLAS, M. M., K. C. TSOU and al.:

Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitro-phenyl substituted ditetrazole.

J. Histochem. Cytochem. 5, 420-436 (1957)

NACHLAS, M. M., M. D. WALKER and A. M. SELIGMAN:

Histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase.

J. Biophys. and Biochem. Cytol. 4, 29-38 (1958)

NEEDHAM, D. M.:

Adenosine triphosphate and the structural proteins in relation to muscle contraction.

Advances Enzymol. N. Y. 13, 151-197 (1952)

NEUFELD, H. A., C. R. SCOTT and E. STOTZ:

Purification of heart muscle succinic dehydrogenase.

J. Biol. Chem., Baltimore 210, 869-876 (1954)

NOVIKOFF, A.B.:

Correlated morphological and chemical studies in tumor cytochemistry.
Unio Internat. contra Cancerum Acta 16, 966-972 (1960)

NOSALEVIC, O.M.:

Histochemische Untersuchungen der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bei Präcancer und Krebs der Mamma. Referat in:
Ber.allgem.spez.Path. (Berlin) 26, 21 (1954)

PAEK, S.:

Histochemisches Enzymmuster der Mamma unter dem experimentellen Einfluß von Geschlechtshormonen.
Med.Diss. Mainz 1967

PERRINI, F.:

Action of stilboestrol and progesterone on the mammary gland.
Giorn.obstetr.Ginec. 17, 59-74 (1953)

RAPORT, C.M.:

Medizinische Biochemie.
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1962

REIS, J.L.:

The specificity of phosphomonoesterases in human tissues.
Biochem.J., London 48, 548-551 (1951)

RUDOLPH, G.:

Die Enzymhistochemie der DPN-Diaphorase, der TPN-Diaphorase und der Succinodehydrogenase.
Acta histochemica 10, 293-325 (1960)

RUDOLPH, G. und H.O.KLEIN:

Histochemische Darstellung und Verteilung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in normalen Rattenorganen.
Histochemie 4, 238-251 (1964)

RUTENBERG, A.M., M.WOLMAN and M.SELIGMAN:

Comparative distribution of succinic dehydrogenase in six mammals and modification in the histochemical technique.
J.Histochem.Cytochem. 1, 68-76 (1953)

SILVER, J.A.:

Myoepithelial cells in the mammary gland parotid glands.
J.Physiol. (London) 125, 8 (1954)

SMITH, Th. and B. RICHTERLICH:

Patterns of succinoxidase, cytochromoxydase, nucleic acids and other constituents in mammary glands of pregnant and lactating rats.

Arch. Biochem. Biophys. 74, 398-407 (1958)

SUMNER, J. B. and G. F. SOMERS:

Chemistry and methods of enzymes. Ed. 3.

Academic Press, New York 1953

SWANSON, M. A.:

Phosphatases of liver. I. Glucose-6-phosphatase.

J. Biol. Chem., Baltimore 184, 647-659 (1950)

TRAURIG, H. H. and C. H. MORGAN:

The effect of ovarian and hypophyseal hormone on the mammary gland epithelial cell proliferation.

Anat. Rec., Philadelphia 150, 423-430 (1964)

TURNER, Ch. W.:

The mammary gland.

Lucas Brothers Columbia 1952

VERNE, J.:

Etat actuel de la cytochimie de la glande mammaire.

Collow. int. Cent. nat. Rech. sci. 32, 59-66 (1951)

VERNE, J.:

Ein neuer Aspekt der Histologie durch die Lokalisation der Enzyme.

Ärztl. Forschg. 10, Heft 4, 157-166 (1956)

WALKER, D. G.:

A survey of dehydrogenases in various epithelial cells in the rat.

J. Biophys. and Biochem. Cytol. 17, 255-277 (1963)

WANDREY, R.:

Fermenthistochemische Untersuchungen bei Mastopathia fibrosa und Mammakarzinom.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 45, 125-128 (1961)

ZIMMERMANN, H.:

Histochemische Fermentnachweise, ihre Bedeutung in der Pathologie.

Verh. Dtsch. Ges. Path. 42, 374-391 (1959)

Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Bässler möchte ich für die Überlassung
des Themas und Ermöglichung der Arbeit besonders danken.

LEBENS LAUF

Als einziges Kind des Bauunternehmers Gustav Lani und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Lindner, bin ich am 28.11.1939 in Nürnberg geboren. Nachdem ich in meiner Heimatstadt fünf Jahre die Volksschule besucht hatte, trat ich in das Realgymnasium des Landschulheims Neubeuern am Inn ein, wo ich auch im Juli 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Herbst 1960 begann ich das Medizinstudium in Freiburg im Breisgau und wechselte nach zwei Semestern an die Johannes Gutenberg-Universität Mainz über. Am 13. Januar 1967 bestand ich an dieser Universität die Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote "Sehr gut".

Seit März 1967 bin ich als Medizinalassistent im Pathologischen Institut der Universität Mainz tätig.

